第 44 卷 第 4 期
2001 年 11 月

昆 虫 学 报
ACTA ENTOMOLOGICA SINICA

Vol.44，No.4
Nov.，2001

亚洲玉米螟滞育关联蛋白的分离和纯化

毛文富[1]，曹梅讯[2]

（1. 中山大学昆虫学研究所，生物防治国家重点实验室，广州 510275；
2. 中国科学院上海昆虫研究所，上海 200025）

摘要：用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳，在亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 河南种群滞育幼虫血淋巴中发现了 2 种滞育关联蛋白，它们的等电点分别为 5.3 和 4.7；而在亚洲玉米螟上海种群滞育幼虫血淋巴中发现了 1 种滞育关联蛋白，等电点为 4.7。亚洲玉米螟河南种群滞育关联蛋白仅在滞育幼虫血淋巴中存在。亚洲玉米螟上海种群滞育关联蛋白在滞育和非滞育幼虫血淋巴中均存在，只是它们在滞育幼虫血淋巴中的含量明显高于非滞育幼虫血淋巴中的含量。用 30%～50%丙酮沉淀、SephaDex G-100 凝胶过滤和 MONO Q RH 5/5 阴离子交换快速液相法，纯化到了高纯度（≥98%）亚洲玉米螟上海种群滞育幼虫血淋巴中的滞育关联蛋白。

关键词：亚洲玉米螟；滞育关联蛋白；分离纯化

中图分类号：S435.132　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296（2001）04-0389-06

滞育关联蛋白（diapause-associated protein，DAP）是昆虫在滞育期合成、在滞育结束后被利用并消失了的一类蛋白[1～5]。很显然，它们对昆虫滞育状态的维持非常重要。对它们进行充分研究，将有助于我们利用昆虫滞育这一生理事件达到治理害虫的目的。自 1970 年 de Loof 等[6]在滞育马铃薯叶甲 *Leptinotarsa decemlineata* 成虫血淋巴中发现 3 个短日照蛋白（short-day proteins）以来，目前除已在玉米干夜蛾 *Busseola fusca*[7]、棉红铃虫 *Pectinophora gossypiella*[4]、苹果蠹蛾 *Cydia pomonella*[8]、巨座玉米杆草螟 *Diatraea grandiosella*[9]和马铃薯叶甲[3]滞育期血淋巴和脂肪体中发现 DAP 的存在外，在家蚕 *Bombyx mori* 卵[10]、舞毒蛾 *Lymantria dispar* 隐 1 龄幼虫中、后肠[11]、麻蝇 *Sarcophaga crassipalpis* 脑中[12]也发现了它们的存在。前人对 DAP 的研究，大多是运用 SDS-PAGE 电泳对 DAP 进行定性和定量分析，仅玉米干夜蛾和巨座玉米杆草螟的 DAP 得到了纯化[7,13]。

亚洲玉米螟 *Ostrinia furnacalis* 是兼性滞育昆虫，以老熟 5 龄幼虫滞育越冬。亚洲玉米螟在我国分布相当广泛，除西藏和青海未见报道外，其它各省市均有发生。它是我国的主要杂粮害虫，严重影响着我国玉米、谷子和高粱的生产。为探索亚洲玉米螟的滞育机理，我们首先对亚洲玉米螟滞育关联蛋白进行了分离及纯化，目的是为今后更深入研究亚洲玉米螟滞育机理打下基础。

1 材料与方法

1.1 供试虫源及饲养方法

亚洲玉米螟虫源分别采自上海崇明岛和河南省郑州市郊。昆虫饲料采用周大荣等[14]半人

基金项目：国家自然科学基金资助项目
收稿日期：2000-11-07；接受日期：2001-06-20

工饲料新七号配方配制。饲养温度为25℃，相对湿度为70%～90%。非滞育幼虫和成虫在16L:8D的光周期下饲养，滞育幼虫在11L:13D的光周期下饲养。

1.2 血淋巴的收集

用昆虫针刺破老熟5龄幼虫的腹足，将血淋巴滴入用冰块冷却并含有少量苯基硫脲的平板凹槽内；然后将采集的血淋巴与EDTA-钠盐［150 mmol/L氯化钠、5 mmol/L EDTA、100 mmol/L磷酸缓冲液（pH 6.8）］按1:1的比例混合，装入1.5 mL的Eppendorf管中，以1 000×g离心2 min；再将上清转移到另一Eppendorf管中，－30℃的冰箱中保存备用。

1.3 亚洲玉米螟滞育幼虫血淋巴中DAP的检测

用10%、6%和7.5%胶浓度的聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis，PAGE），分别对滞育幼虫血淋巴中的DAP进行检测，并以非滞育幼虫的血淋巴为对照。

1.4 亚洲玉米螟滞育幼虫血淋巴中DAP等电点的测定

DAP的等电点（pI）用4% PAGE测定。40%的载体两性电解质（pH 3.5～10），由上海丽珠东风生物技术有限公司生产。淀粉葡萄糖苷酶（amylglucosidase）pI 3.6，胰蛋白酶抑制剂（trypsin inhibitor）pI 4.6，碳酸酐酶（carbonic anhydrase）pI 6.6为三种标准pI蛋白（Sigma）。

1.5 滞育幼虫血淋巴（上海种群）中DAP的分离与纯化

1.5.1 丙酮分级沉淀（1）一级沉淀所需丙酮最佳浓度的确定：用5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%和40%丙酮分别处理滞育幼虫血淋巴［用0.2 mol/L磷酸缓冲液（pH 6.8）稀释2倍］后，在－20℃的冰箱中放置30 min。然后以10 000×g离心10 min。倒去上清液，把沉淀溶于0.1 mL 0.2 mol/L磷酸缓冲液（pH 6.8）中作为样品备用。6% PAGE分析，确定二级沉淀的最佳丙酮浓度。

（2）二级沉淀所需丙酮最佳浓度的确定：将经过30%丙酮处理的上清液中的丙酮浓度进一步调整到50%、60%和70%，用与上步相同的方法确定二级沉淀的最佳丙酮浓度。

1.5.2 Sephadex G-100凝胶过滤层析：3 mL血淋巴样品经30%～50%丙酮分级沉淀后，溶于2 mL 0.2 mol/L的磷酸缓冲液中，用Sephadex G-100柱（1 000 mm×250 mm）进行分离。洗脱流速为10 mL/h［洗脱液为0.02 mol/L的磷酸缓冲液（内含0.05 mol/L NaCl，pH 6.8）］，每管收集3.5 mL洗脱液。收集后，用紫外分光光度仪检测每管洗脱液在280 nm波长处的吸光度，然后绘制色谱图。最后用6% PAGE检测DAP洗脱峰在色谱图中的位置。

1.5.3 快速液相纯化：用NAP-10柱对1 mg层析所得样品脱盐［所用缓冲液为20 mmol/L磷酸缓冲液（pH 5.5）］，上快速液相分离柱MONO Q HR 5/5（Pharmacia）进行分离。1～5 min用含0.05 mol/L NaCl的20 mmol/L Tris-HCl（pH 5.5）洗脱；5～20 min NaCl的浓度从0.05升到0.11 mol/L；20～26 min用含1 mol/L NaCl的20 mmol/L Tris-HCl（pH 5.5）洗脱；26～32 min用含0.05 mol/L NaCl的20 mmol/L Tris-HCl（pH 5.5）洗脱。流速为1 mL/min。检测器检测波长为280 nm。DAP的纯度用6% PAGE检测。

2 结果

2.1 亚洲玉米螟滞育幼虫血淋巴中DAP的种类

试验结果表明，采用10%和7.5% PAGE结合考马斯亮蓝R250染色，不能检测到亚洲玉

米螟滞育幼虫血淋巴中有 DAP 存在，只有用 6% PAGE 才能清晰检测到 DAP 存在。虽然两个种群非滞育幼虫血淋巴的蛋白带型是一样的，但滞育幼虫血淋巴中 DAP 的带型上却存在差异。上海种群滞育幼虫血淋巴中存在 1 种 DAP，而河南种群滞育幼虫血淋巴中则存在 2 种 DAP。上海种群非滞育幼虫血淋巴中也存在 DAP，只是它的含量比滞育幼虫低得多；而河南种群的 2 种 DAP 仅存在于滞育幼虫血淋巴中，在非滞育幼虫血淋巴中检测不到（图 1）。

2.2 DAP 的等电点测定

为确定 Tris-HCl 缓冲液合适的 pH 值，使 MONO Q HR5/5 快速液相有效地把 DAP 分离出来，我们用 4% PAGE 等电聚焦电泳结合考马斯亮蓝 R250 染色，测定了亚洲玉米螟上海种群和河南种群 DAP 的等电点。上海种群 DAP 的等电点为 4.7，河南种群两个 DAP 的等电点分别为 4.7 和 5.3（图 2）。

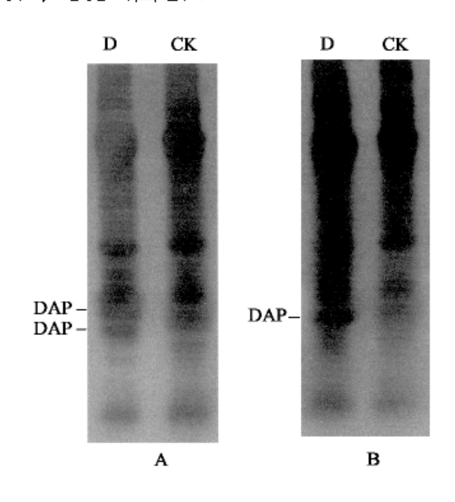


图 1　亚洲玉米螟河南种群（A）和上海种群（B）滞育幼虫血淋巴 6% PAGE 图谱

Fig. 1　Resolution of hemolymph from diapausing larvae of Henan population（A）and Shanghai population（B）of *Ostrinia furnacalis* by 6% PAGE

D 和 CK 分别为滞育和非滞育幼虫血淋巴 D and CK was the hemolymph from diapausing and non-diapausing larvae, respectively

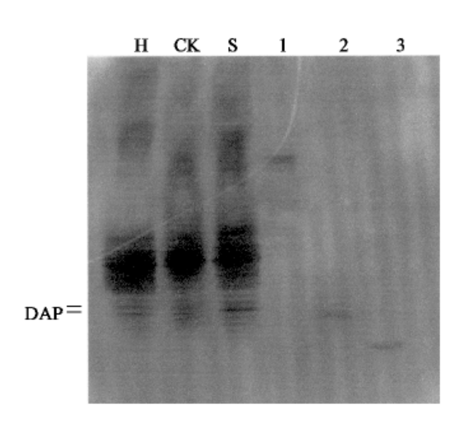


图 2　亚洲玉米螟河南种群与上海种群滞育幼虫血淋巴 4% PAGE 等电聚焦电泳图谱

Fig. 2　Determination of isoelectric points for DAPs of Henan and Shanghai populations by isoelectric focusing（4% PAGE）

CK 和 S 分别为亚洲玉米螟上海种群非滞育和滞育幼虫血淋巴，H 为河南种群滞育幼虫血淋巴，1～3 为标准等电点蛋白（pI 6.6，4.6，和 3.6）

CK and S was the hemolymph from non-diapausing and diapausing larvae of Shanghai population, respectively; H was the hemolymph from diapausing larvae of Henan population; 1～3: pIs for the standard proteins（6.6，4.6 and 3.6）

2.3 亚洲玉米螟上海种群 DAP 的分离与纯化

2.3.1 丙酮分级沉淀 DAP：滞育幼虫血淋巴中含有大量的杂蛋白，这些杂蛋白严重干扰目标蛋白的分离。为此，我们用丙酮沉淀法来去除它们。当丙酮浓度达到 30% 时，大量杂蛋白沉淀下来，而 DAP 却留在上清液中；当丙酮浓度上升到 30% 以上时，DAP 才大量下沉（图 3：A）。因此，30% 丙酮为一级沉淀的最佳浓度。当把上清液中丙酮浓度从 30% 调整到 40% 时，虽然 DAP 能很专一地沉淀下来，但上清液中还残存一定量的 DAP；只有进一步将上清液中的丙酮浓度调整到 50% 以上时，DAP 才能全部沉淀下来，并且杂质含量较少（图 3：B）。因此，

>50%的丙酮浓度是二级沉淀的最佳浓度。

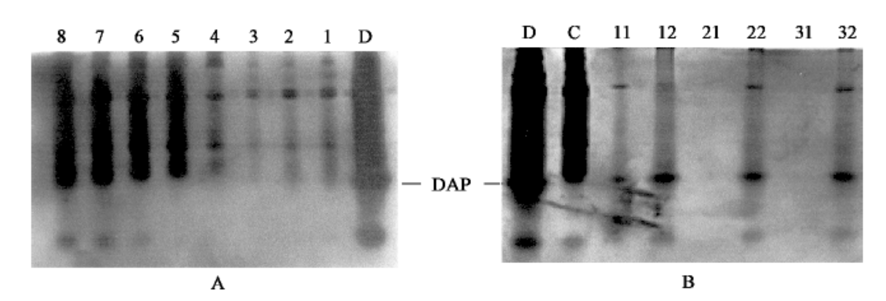


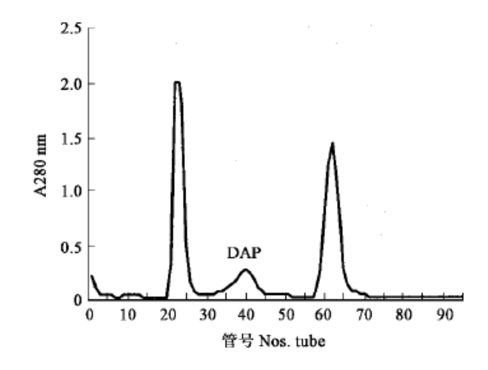
图3 亚洲玉米螟上海种群DAP丙酮一级沉淀（A）和二级沉淀（B）6%PAGE电泳图谱

Fig. 3 6% PAGE of the primary precipitation (A) and the second precipitation (B) of DAP of Shanghai population

D：滞育幼虫血淋巴；C：30%丙酮处理滞育幼虫血淋巴后的上清液；1~8：分别为丙酮在滞育幼虫血淋巴中的浓度（5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%和40%）；11、21和31分别为把30%上清中丙酮浓度调整到40%、50%和60%后的上清液，12、22和32为相应的沉淀

the lane D: the hemolymph of diapausing larvae; the lane C: the supernatant of the hemolymph from diapausing larvae treated with 30% acetone; the lanes 1~8: 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% and 40% acetone, respectively; the lanes 11, 21 and 31: the supernatant of the hemolymph from diapausing larvae treated with 30%~40%, 30%~50% and 30%~60% acetone respectively; the lanes 12, 22 and 32: the corresponding precipitates

2.3.2 Sephadex G-100凝胶过滤层析：先把用30%~50%丙酮分级沉淀后的样品溶于2 mL 0.2 mol/L的磷酸缓冲液（pH 6.8），然后经Sephadex G-100凝胶过滤分离。它的洗脱曲线中有3个蛋白洗脱峰，穿过峰含量最高，中间峰含量最低，最后一个峰含量居中（图4）。6%PAGE检测各洗脱峰表明，穿过峰和最后一个峰为杂质，第2个峰才是DAP的洗脱峰，它在电泳图谱中已成为一条主带，杂质非常少。



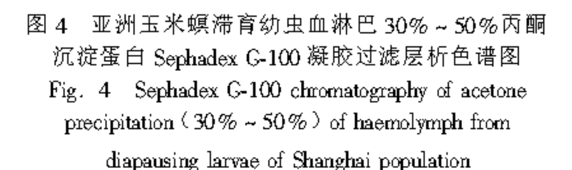


图4 亚洲玉米螟滞育幼虫血淋巴30%~50%丙酮沉淀蛋白Sephadex G-100凝胶过滤层析色谱图

Fig. 4 Sephadex G-100 chromatography of acetone precipitation (30%~50%) of haemolymph from diapausing larvae of Shanghai population

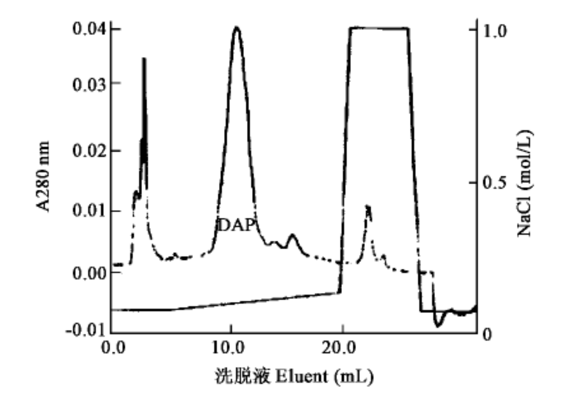


图5 上步样品MON Q RH 5/5快速液相色谱图

Fig. 5 Elution profile showing the separation of the sample from the previous step by ion exchange chromatography on MON Q RH 5/5

2.3.3 MONO Q HR 5/5 快速液相纯化：尽管 DAP 经过分级沉淀和凝胶过滤层析已经比较纯，但要用于抗体的制备和 N 端氨基酸序列测定，它的纯度仍然不够。为此，我们又对它进行了一次 MONO Q HR 5/5 快速液相纯化。样品经 MONO Q HR 5/5 快速液相分离后，除穿过峰和 1 mol/L NaCl 洗脱下的峰外，在其余 3 个峰中，DAP 的洗脱峰是最大的峰，其余两个峰非常小，且 DAP 的分离效果非常好（图 5）。用 6% PAGE 对 DAP 洗脱峰的样品进行分离，并用考马斯亮蓝 R250 染色后，经光密度扫描分析测定，其纯度达 98% 以上，这完全符合进一步实验的需要。

3 讨论

滞育是一种现象，昆虫体内物质的变化才是滞育产生的本质。DAP 就是其中的一类蛋白，它有两种类型：一种是仅在滞育昆虫体内存在，而在非滞育昆虫体内不存在[4,7,12]；另一种是在滞育和非滞育昆虫体内均存在，只是在滞育昆虫体内含量升高[8,9]。我们运用 6% PAGE，在亚洲玉米螟上海种群的滞育老熟幼虫血淋巴中发现了一种 DAP（pI 4.7）；而在河南种群的滞育老熟幼虫血淋巴中则发现了 2 种 DAP（pI 4.7、pI 5.3）。亚洲玉米螟上海种群的 DAP 属于后一种类型，它们既存在于滞育幼虫血淋巴中也存在于非滞育幼虫血淋巴中，当幼虫滞育后，它们在血淋巴中的含量明显上升。而亚洲玉米螟河南种群的 DAP 则属于前一种类型。这是首次报道在同一种昆虫的不同地理种群之间，滞育个体产生的 DAP 种类存在差异。因此，研究亚洲玉米螟不同地理种群滞育幼虫产生的 DAP，很可能会成为研究亚洲玉米螟进化的一个突破口。为什么同一种昆虫在不同地区的 DAP 会有不同？这些不同的 DAP 功能又是什么？这些都是值得进一步研究的、非常有意义的课题。

继玉米干夜蛾的 DAP 和巨座玉米杆草螟的 DAP 被纯化后[7,13]，我们经过多次实验和调整，设计出了以丙酮分级沉淀、Sephadex G-100 凝胶过滤层析和快速液相为基础，结合等电点测定确定快速液相洗脱缓冲液 pH 值的方法，建立了一个简便、快速的亚洲玉米螟上海种群 DAP 的分离流程，并运用该流程，成功地从亚洲玉米螟上海种群的滞育老熟幼虫血淋巴中纯化到了一定数量的 DAP（纯度 ≥98%），这为进一步研究 DAP 的理化性质、基因结构和功能打下了重要基础。

参 考 文 献 （References）

[1] Dortland J F. Synthesis of vitellogenins and diapause proteins by the fat body of *Leptinotarsa decemlineata*, as a function of photoperiod. Physiol. Entomol., 1978, 3: 281～288

[2] Ichimori T, Ohtomo R, Suzuki K *et al*. Specific protein related to adult diapause in the leaf beetle, *Gastrophysa atrocyanea*. J. Insect Physiol., 1990, 36: 85～91

[3] Koopmanschap A B, Lammers H, de Kort S. Storage proteins are present in the hemolymph from larvae and adults of the Colorado potato beetle. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1992, 20: 119～133

[4] Salama M S, Miller T A. A diapause associated protein of the pink bollworm *Pectinophora gossypiella* Saunders. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1992, 21: 1～11

[5] Venkatesh K, Chippendale G M. Synthesis and release of proteins from cultured larval fat body of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. Insect Biochem., 1986, 16: 917~927

[6] de Loof A, de Wilde J. Hormonal control of synthesis of vitellogenic female protein in the Colorado beetle, *Leptinotarsa decemlineata*. J. Insect Physiol., 1970, 16: 1 455~1 466

[7] Osir E O, Labongo L V, Unnithan G C. A high molecular weight diapause-associated protein from the stem-borer, *Busseola fusca*: purification and properties. Arch. Insect Biochem. Physiol., 1989, 11: 173~187

[8] Brown J J. Haemolymph protein reserves of diapausing codling moth larvae, *Cydia pomonella* (L.) (Lepidoptera: Tortricidae). Arch. Insect Biochem. Physiol., 1980, 26: 487~491

[9] Brown J J, Chippendale G M. Juvenile hormone and a protein associated with the larval diapause of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. Insect Biochem., 1978, 8: 359~367

[10] Sonobe H, Odake H. Studies on embryonic diapause in the pnd mutant of the silkworm, *Bombyx mori*. Roux's Arch. Dev. Biol., 1986, 195: 229~235

[11] Lee K Y, Denlinger D L. Diapause-regulated proteins in the gut of pharate first instar larvae of the gypsy moth, *Lymantria dispar*, and the effect of KK-42 and neck ligation on expression. J. Insect Physiol., 1995, 42: 423~431

[12] Joplin K H, Yocum G D, Denlinger D L. Diapause specific proteins expressed by the brain during the pupal diapause of the flesh fly, *Sarcophaga crassipalpis*. J. Insect Physiol., 1990, 36: 775~783

[13] Dillwith J W, Chippendale G M. Purification and properties of a protein that accumulates in the fat body of pre-diapausing larvae of the southwestern corn borer, *Diatraea grandiosella*. Insect Biochem., 1984, 14: 369~381

[14] 周大荣，王玉英，刘宝兰等. 玉米螟人工大量繁殖研究：Ⅰ. 一种半人工饲料及其改进. 植物保护学报，1980，7: 113~122

Isolation and purification of diapause-associated proteins from hemolymph in *Ostrinia furnacalis*

MAO Wen-fu[1], CAO Mei-xun[2]

(1. State Key Laboratory for Biocontrol, Institute of Entomology, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China;
2. Shanghai Institute of Entomology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200025, China)

Abstract: By 6% PAGE, it was found that there were two kinds of diapause-associated proteins (DAP) (pI 5.3, 4.7) in the hemolymph of diapausing larvae from Henan population and one kind of DAP (pI 4.7) in the hemolymph of diapausing larvae from Shanghai population of *Ostrinia furnacalis*. The DAPs of *O. furnacalis* from Henan population were found only in the hemolymph of diapausing larvae. Although the DAP of *O. furnacalis* from Shanghai population was found in the hemolymphs of both non-diapausing and diapausing larvae, it had higher titer in diapausing larvae. By means of 30%~50% acetone fractionation, Sephadex G-100 gel filtration chromatography and MONO Q RH 5/5 FPLC, the high pure DAP(≥98%)from the hemolymph of larvae from Shanghai population was isolated.

Key words: isolation and purification; diapause-associated proteins; *Ostrinia furnacalis*